



TITLE:

# Novel methods for drug discovery and development using ligand-directed chemistry( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Yamaura, Kei

---

CITATION:

Yamaura, Kei. Novel methods for drug discovery and development using ligand-directed chemistry. 京都大学, 2016, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2016-09-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20002>

RIGHT:

許諾条件により要旨は2016-10-01に公開

京都大学	博士（工 学）	氏名	山浦 圭
論文題目	Novel methods for drug discovery and development using ligand-directed chemistry (リガンド指向性化学の新規創薬開発への展開)		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>創薬開発は大きく分けて drug discovery と drug development の 2 つのプロセスからなる。具体的には、drug discovery はアッセイ系の開発、それを用いたスクリーニング、スクリーニングでヒットした化合物の validation、そして、ヒットした化合物の最適化からなる。Drug development では、drug discovery で選別されたリード化合物を前臨床試験し、さらに臨床試験を経て、薬として認可される。現在、その創薬開発の効率は年々低下しており、薬剤スクリーニングから実際に薬となる確率は 1/30000 となっている。このことから、創薬開発において新たな手法の開発が求められている。実際に創薬開発において求められている技術としては、drug discovery においては、アッセイ系の開発が求められており、drug development においては、副作用をできるだけ抑えることが求められている。</p> <p>創薬開発効率の低下を解決する方法として、ケミカルバイオロジーの技術を創薬開発に取り入れることが注目されている。そのケミカルバイオロジーの技術の 1 つとして、リガンド指向性化学がある。本手法は、リガンドの近接効果を利用することで、生体内で直接的に標的蛋白質に対して選択的な化学修飾が可能である。そのため、特定の蛋白質の機能解析をする上で有用である。本論文では、リガンド指向性化学を用い、創薬開発へと展開した結果をまとめたものであって、3 章からなっている。</p> <p>第 1 章では、細胞表層において標的蛋白質に対して選択的・部位特異的かつ traceless な修飾が可能なりガンド指向性 Acyl Imidazole 化学（LDAI 化学）を用いることで、主要な抑制性の神経伝達物質受容体である GABA<sub>A</sub> 受容体の薬剤結合部位を蛍光ラベル化し、バイオセンサー化した。GABA<sub>A</sub> 受容体は向精神薬の標的であり、創薬ターゲットとして注目されているが、複数のサブユニットからなる 5 量体のタンパク質であることから、構造情報が不十分である。このため、従来の手法ではバイオセンサー化が困難であった。そこで、構造情報が不要な LDAI 化学を用いることによって蛍光色素をラベル化した。バイオセンサー化には BFQR(bimolecular fluorescence quenching and recovery) システムを組み合わせることで構築した。本手法は消光剤を用いることで、薬剤結合部位近傍にラベル化された蛍光色素との FRET 機構により、turn-on 型でリガンドを読み出す方法である。具体的には、ラベル化する GABA<sub>A</sub> 受容体の薬剤結合部位としては、オルソステリック (GABA) 及びアロステリック (ベンゾジアゼピン) 結合部位を選択し、生細胞系においてそれぞれバイオセンサー化を行った。構築したバイオセンサーはリガンド選択性を有するのみならず、リガンドの親和性を評価できることを示した。また、ベンゾジアゼピン結合部位に関しては、複数種類の GABA<sub>A</sub> 受容体に対して同様にバイオセンサー化できることが分かり、このバイオセンサー化法の柔軟性が高いことが示された。さらには、複数種類のベンゾジアゼピン結合部位のバイオセンサーを用いることによって特定の GABA<sub>A</sub> 受容体選択的なリガンドを見分けられることを示した。これらのことから、本章で開発したアッセイ系は複雑で構造情報のないタンパク質にも応用可能であることが期待される。</p> <p>第 2 章では、現在の創薬開発において、アロステリック結合部位に作用する薬剤が注目を浴びている。それは、オルソステリック結合部位よりも選択性が高く、副作用を低減できるためである。従って、アロステリック結合部位に結合するリガンドを選択的に検出可能な創薬スクリーニング法の開発が求められている。GABA<sub>A</sub> 受容体には複数アロステリック結合部位があるが、その中でベンゾジアゼピン結合部位は特に創薬標的として注目されている。例えば、抗不安薬や睡眠薬などの標的</p>			

京都大学	博士（工 学）	氏名	山浦 圭
<p>であり、さらには近年アルツハイマー病や統合失調症の治療薬の標的としても注目されている。従って、ベンゾジアゼピン結合部位に作用するリガンドを見つけ出すことは創薬開発において非常に有用である。そこで、第 1 章において構築したベンゾジアゼピン結合部位に対する蛍光性バイオセンサーを薬剤スクリーニングへと展開した。ハイスループットスクリーニングによって化合物ライブラリから 4 つの化合物がヒットした。得られたヒット化合物の結合様式について詳細に調べることで、4 つのうち 2 つがベンゾジアゼピン結合部位に結合することが分かり、残りの 2 つに関しては、ベンゾジアゼピン結合部位には結合しないが、GABA<sub>A</sub> 受容体には結合し、ベンゾジアゼピン結合部位の構造変化を引き起こしていることが示唆された。このことから、ベンゾジアゼピン結合部位に対する蛍光性バイオセンサーはベンゾジアゼピン結合するリガンドのみならず、構造変化を引き起こすリガンドをも検出できることが示された。</p> <p>第 3 章では、副作用は多くの場合で標的蛋白質(オンターゲット)とは異なる蛋白質(オフターゲット蛋白質)と薬剤が結合することによって引き起こされる。このことから、副作用を引き起こすオフターゲット蛋白質の同定ができれば、副作用のない薬剤開発につながれることから、創薬開発において非常に重要である。このことから、細胞内において標的蛋白質に対して選択的・部位特異的かつ traceless な修飾が可能なリガンド指向性 tosyl 化学 (LDT 化学) を用いることで、薬剤のオフターゲット蛋白質の同定を行った。LDT 化学はリガンドの近接効果を利用するため、標的蛋白質(オンターゲット)のみならず、オフターゲット蛋白質もラベル化可能であることが期待される。具体的には、薬剤として抗 HER2 薬ラパチニブを選択し、HER2 を内在的に発現している胃がん細胞においてラベル化を行った。その結果、HER2 以外にラパチニブ添加によって阻害のかかるバンドが見られた。このバンドはラパチニブによって阻害がかかることから、オフターゲットであることが考えられる。MS 解析によって同定したところ、PDI(protein disulfide isomerase)であることが明らかとなった。PDI は細胞内でエストラジオールなどのステロイドホルモンの貯蔵やジスルフィド形成を触媒する蛋白質である。試験管内におけるラベル化阻害実験の結果、ラパチニブが PDI のエストラジオール結合部位に結合していることが示された。さらに、ラパチニブはステロイドホルモンによる PDI の活性制御に干渉することを実証した。従って、PDI はラパチニブのオフターゲット蛋白質であることが示された。これらのことから、LDT 化学が薬剤オンターゲットのみならず、オフターゲット蛋白質の検出及び同定に有用であることが示された。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、リガンド指向性化学の創薬開発への応用展開した結果をまとめたものであり、得られた成果は次のとおりである。

1. 細胞表層において標的蛋白質に対して選択的・部位特異的かつ traceless な修飾が可能なりガンド指向性 Acyl Imidazole 化学 (LDAI 化学) を用いることで、主要な抑制性の神経伝達物質受容体である GABA<sub>A</sub> 受容体の薬剤結合部位をラベル化し、バイオセンサー化に成功した。構築したバイオセンサーはリガンド選択性を有するのみならず、リガンドの親和性を評価できることを示した。また、ベンゾジアゼピン結合部位に関しては、複数種類の GABA<sub>A</sub> 受容体に対して同様にバイオセンサー化できることが分かり、このバイオセンサー化法の柔軟性が高いことが示された。さらには、複数種類のベンゾジアゼピン結合部位のバイオセンサーを用いることによって特定の GABA<sub>A</sub> 受容体選択的なりガンドを見分けられることを示した。

2. 第 1 章において構築したベンゾジアゼピン結合部位に対する蛍光性バイオセンサーを薬剤スクリーニングへと展開した。ハイスループットスクリーニングによって化合物ライブラリから 4 つの化合物がヒットした。得られたヒット化合物の結合様式について詳細に調べることで、4 つのうち 2 つがベンゾジアゼピン結合部位に結合することが分かり、残りの 2 つに関しては、ベンゾジアゼピン結合部位には結合しないが、GABA<sub>A</sub> 受容体には結合し、ベンゾジアゼピン結合部位の構造変化を引き起こしていることが示唆された。このことから、ベンゾジアゼピン結合部位に対する蛍光性バイオセンサーはベンゾジアゼピン結合するリガンドのみならず、構造変化を引き起こすリガンドをも検出できることが示された。

3. 標的蛋白質に対して選択的・部位特異的かつ traceless な修飾が可能なりガンド指向性 tosyl 化学 (LDT 化学) を用いることで、ラパチニブのオフターゲット蛋白質の同定に成功した。LDT 化学はリガンドの近接効果を利用するため、標的蛋白質(オンターゲット)のみならず、オフターゲット蛋白質もラベル化可能であることが期待される。HER2 を内在的に発現している胃がん細胞においてラベル化を行った結果、HER2 以外にラパチニブ添加によって阻害のかかるバンドが見られた。このバンドはラパチニブによって阻害がかかることから、オフターゲットであることが考えられる。MS 解析によって同定したところ、PDI (protein disulfide isomerase) であることが明らかとなった。また、ラパチニブはステロイドホルモンによる PDI の活性制御に干渉することを実証した。

本論文は、上記の通り、リガンド指向性化学の創薬開発への応用展開を達成しており、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 28 年 8 月 8 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

要旨公開可能日： 2016 年 10 月 1 日以降